



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑧7 EP 0 346 022 B1

⑩ DE 689 25 660 T 2

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 07 K 7/08
A 61 K 38/00

②1	Deutsches Aktenzeichen:	689 25 660.4
⑧6	Europäisches Aktenzeichen:	89 305 604.4
⑧6	Europäischer Anmeldetag:	2. 6. 89
⑧7	Erstveröffentlichung durch das EPA:	13. 12. 89
④6	Veröffentlichungstag der Patentansprüche in deutscher Übersetzung:	23. 5. 90
⑧7	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	14. 2. 96
④7	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	26. 9. 96

DE 689 25 660 T 2

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1
10.06.88 GB 8813746 05.07.88 GB 8815956
11.11.88 GB 8826445

⑦3 Patentinhaber:
United Biomedical, Inc., Hauppauge, N.Y., US

⑦4 Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, ES, FR, GR, IT, LI, LU, NL, SE

⑦2 Erfinder:
McMichael, Andrew James, Horton-cum-Studley
Oxford, GB; Nixon, Douglas Fraser, Headington
Oxford OX3 0NX, GB; Townsend, Alain Robert
Michael, Oxford OX2 6JN, GB

⑤4 Peptidfragmente von HIV

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 689 25 660 T 2

EP-B-0 346 022
(89 30 5604.4)
United Biomedical, Inc.
u. Z.: EP-3549

Peptidfragmente von HIV

Die Erfindung betrifft Peptidfragmente von HIV (menschliches Immundefizienzvirus) und ihre Verwendung in einem potentiellen Impfstoff gegen AIDS (Syndrom der erworbenen Immunschwäche) und zur Diagnose und Therapie.

Hintergrund der Erfindung

Im Stand der Technik (Walker et al., Nature 328 (1987), 345-348) ist bekannt, daß Antworten cytotoxischer T-Lymphocyten (CTL) auf das Hüllprotein (env) von HIV in Menschen erzeugt werden können. Die gleichen Autoren nahmen an, daß einige zelluläre Antworten auf das Gruppenassoziations-Antigen (gag) von HIV in infizierten Individuen ebenfalls vorhanden waren, konnten jedoch nicht nachweisen, daß irgendwelche dieser Antworten durch CTLs vermittelt wurden.

Takahashi et al. (PNAS USA 85 (1988), 3105-3109) konnten ein Peptidfragment von env identifizieren, das als ein immundominantes Epitop in Mäusen des H-2^d-Haplotyps wirkte. Eine CTL-Antwort dieser Mäuse auf das Epitop wurde nachgewiesen, und die Autoren nahmen an, daß das Epitop auch in Menschen als Epitop wirken kann, obwohl kein Beweis zur Stützung dieser Annahme vorgelegt wurde.

Insgesamt war wenig über CTL-Antworten auf HIV in Menschen bekannt, besonders im Zusammenhang mit angeblichen Antworten auf das gag-Protein.

Zusammenfassung der Erfindung

Ein erster erfindungsgemäßer Gesichtspunkt betrifft die Bereitstellung eines in vitro-Verfahrens zur Stimulierung HIV-spezifischer cytotoxischer T-Lymphocyten (CTL), umfassend den Erhalt peripherer mononucleärer Blutzellen (PBMC) von einem Individuum, das HIV-seropositiv ist, die Inkubation einer Fraktion der PBMC mit Phytohämagglutinin für einen Zeitraum, der ausreichend ist zur Aktivierung der CTL und dabei zur Produktion aktivierter PBMC, das Waschen der aktivierten PBMC und die gemeinsame Züchtung der aktivierten PBMC mit einer zweiten, unstimulierten Fraktion der PBMC für einen Zeitraum, der zur Produktion gezüchteter, CTL-enthaltender PBMC ausreichend ist.

Mit diesem Verfahren konnten CTL erstaunlich wirksam erzeugt werden.

Ein zweiter erfindungsgemäßer Gesichtspunkt betrifft die Bereitstellung eines Verfahrens zum Absuchen eines Peptids nach einem HIV-spezifischen CTL-Epitop, umfassend: den Erhalt von PBMC von einem Individuum, das HIV-seropositiv ist; die Inkubation einer Fraktion der PBMC mit Phytohämagglutinin für einen Zeitraum, der ausreichend ist zur Aktivierung der CTL und dabei zur Produktion aktivierter PBMC; das Waschen der aktivierten PBMC; die gemeinsame Züchtung der aktivierten PBMC mit einer zweiten Fraktion von unstimulierten PBMC für einen Zeitraum, der zur Produktion gezüchteter, CTL-enhaltender PBMC ausreichend ist; die Inkubation der gezüchteten PBMC mit markierten autologen Zielzellen oder lymphoblastoiden B-Zellen, die auf einen menschlichen Leukocytenantigen (HLA)-Typ und das Peptid abgestimmt sind; und die Bestimmung der Menge an freigesetztem Marker und die dadurch bedingte Identifizierung eines HIV-spezifischen CTL-Epitops.

Ein dritter Gesichtspunkt betrifft die Bereitstellung eines Peptids, das durch das vorstehend beschriebene Verfahren identifiziert werden kann, wobei es die Aminosäuresequenz eines Fragments des gag-Proteins von HIV hat, das mit einem bestimmten HLA-Klasse I-Molekül unter Stimulierung der CTL-Immunität spezifisch interagiert.

Ein solches Peptid weist die Sequenz NH_2 -Lysin-Arginin-Tryptophan-Isoleucin-Isoleucin-Leucin-Glycin-Leucin-Asparagin-Lysin-Isoleucin-Valin-Arginin-Methionin-Tyrosin-Cystein-COOH auf, die vom gag (Gruppenassoziations-Antigen)-p24-Protein von HIV (d. h., einem der internen Kernproteine) zwischen den Resten 263 und 277 stammt. Das Carboxy-terminale Cystein ist nicht Teil der gag-Sequenz und wird zur Erleichterung der chemischen Kopplungsreaktionen zugesetzt. Dieses Peptid interagiert spezifisch mit HLA B27, und Individuen mit HLA B27 (etwa 7% der kaukasischen Bevölkerung) antworten auf das Peptid, was eine Produktion von gag- und HLA B27-spezifischen cytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) und eine Lyse von HIV-infizierten Zellen bewirkt.

Andere Peptide interagieren spezifisch mit anderen HLA-Molekülen und zeigen auch bei Individuen mit dem relevanten HLA-Molekül ein entsprechendes Verhalten.

Es wurde erläutert, daß Virusproteine wie gag den T-Zellen als abgebaute Peptidfragmente (etwa 15 Aminosäuren), die an größere HLA-Klasse I-Moleküle gebunden sind, auf der Oberfläche von infizierten Zellen präsentiert werden. Unterschiedliche Peptidbereiche (Epitope) werden erkannt und interagieren spezifisch mit unterschiedlichen HLA-Klasse I-Molekülen. CTL erkennen nur Zielzellen, die HLA-Klasse I-Moleküle aufweisen, d. h., die T-Zellen erkennen eine Kombination von

Virusantigen plus eigenem HLA. Es gibt wahrscheinlich etwa 120 unterschiedliche HLA-Klasse I-Moleküle, und jeder einzelne Mensch besitzt eine begrenzte Auswahl und antwortet daher nur auf bestimmte Epitope.

Epitope, die mit unterschiedlichem HLA erkannt werden, können auf bekannte Weise identifiziert und isoliert oder unter Verwendung von bekannten Verfahren durch Proteinsynthese hergestellt werden.

Erfindungsgemäße Peptide können als Basis eines Impfstoffs gegen AIDS verwendet werden, indem die Produktion von CTL, die auf das jeweilige HLA antworten, stimuliert und so die CTL-Antwort induziert wird.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gesichtspunkt betrifft die Bereitstellung eines AIDS-Impfstoffs, der ein Peptid umfaßt, das durch das vorstehend beschriebene Verfahren identifiziert werden kann, wobei es die Aminosäuresequenz eines Fragments des gag-Proteins von HIV aufweist, das mit einem bestimmten menschlichen Leukozytenantigen (HLA)-Klasse I-Molekül unter Stimulierung der CTL-Immunität spezifisch interagiert.

Der Impfstoff umfaßt vorzugsweise ein Peptid, das mit einem relativ üblichen HLA-Klasse I-Molekül interagiert, wie HLA A2, das in etwa 40 % der Bevölkerung festgestellt wird, oder HLA A1, A3, B7 oder B44, von denen jedes in etwa 10 % der Bevölkerung gefunden wird.

Der Impfstoff kann mehr als ein Peptid umfassen und umfaßt zur Erhöhung der Wirksamkeit vorzugsweise Peptide, die mit einigen der stärker verbreiteten HLA-Klasse I-Molekülen reagieren. Ein Impfstoff, der Peptide aufweist, die mit HLA A1, A2, A3, B7 und B44 reagieren, stimuliert beispielsweise CTL-Antworten in etwa 90 % der Bevölkerung; die verbleibenden 10 % konnten durch Gruppenimmunität geschützt werden.

Der Impfstoff kann unterschiedliche Formen aufweisen. Der Impfstoff kann beispielsweise ein Peptid oder ein Gemisch von Peptiden umfassen, die in gelöster Form, nach Absorption auf unlöslichem Material oder in Form eines Gemisches mit einem Adjuvans verabreicht werden. Die Aminosäuresequenz des Peptids kann alternativ zur Konstruktion von synthetischen oder Fusions-Proteinen, die die relevanten Peptidepitope enthalten, durch bekannte DNA-Rekombinationsverfahren verwendet werden. Diese Proteine können in Form einer Lösung, nach Absorption auf unlöslichem Material oder in Form eines Gemisches mit einem Adjuvans verwendet werden. Alternativ kann die Sequenzinformation verwendet werden, um unter Verwendung bekannter Verfahren rekombinante Mikroorganismen zu konstruieren, die die jeweiligen Sequenzen als eigene Proteine exprimieren. Beispiele dafür sind rekombinante

Vacciniaviren, rekombinante Poliomyelitisviren, rekombinante BCG, rekombinante Salmonellen und rekombinantes Adenovirus.

Die Sequenzinformation kann ferner zur Konstruktion von Peptidanalogen oder anderen Chemikalien verwendet werden, die mit den jeweiligen HLA-Molekülen oder T-Zellrezeptoren interagieren, z. B. daran binden, und diese Form der Immunantwort stören oder stimulieren. Eine Hemmung dieser Art von Immunität kann wichtig sein, wenn diese Immunantwort im Zusammenhang mit jeglicher HIV-verursachten Pathologie nachteilig ist. In einem solchen Fall ist es wichtig, das Niveau dieser Art von T-Zellimmunität in HIV-seropositiven Individuen zu regulieren, um einen Ausgleich zwischen vorteilhaften und nachteiligen Wirkungen zu erreichen. Eine Stimulierung durch solche Wirkstoffe kann ein alternativer Weg zur Induzierung einer Immunantwort in seronegativen Individuen sein.

Das Verfahren zum Absuchen eines Peptids nach einem erfindungsgemäßen HIV-spezifischen CTL-Epitop kann auch zu Diagnosezwecken verwendet werden. Insbesondere wurde festgestellt, daß zur Identifizierung einer T-Lymphocyten-Antwort ein Peptid, von dem bekannt ist, daß es ein solches Epitop umfaßt, in einem relativ einfachen Test verwendet werden kann. Kurz gesagt werden frische periphere mononucleäre Blutzellen (oder aus Biopsymaterial erhaltene Lymphocyten) hergestellt und in Verhältnissen von 50:1, 25:1 und 10:1 zu 10^4 $^{51}\text{Chrom}$ -markierten lymphoblastoiden B-Zellen, die auf das relevante HLA-Molekül abgestimmt sind, zugesetzt. Der HLA-Typ des Patienten wird in bekannter Weise durch Gewebetypisierung bestimmt, und die lymphoblastoiden B-Zellen werden von einem Spender mit bekanntem HLA-Typ (erneut in bekannter Weise durch Gewebetypisierung ermittelt) erhalten und unter Verwendung von bekannten Verfahren mit dem Epstein-Barr-Virus transformiert. Ein erfindungsgemäßes Peptid, das mit dem relevanten HLA-Molekül interagiert, wird den Zellen in einer Konzentration von 10 bis 100 μmolar ebenfalls zugesetzt. Nach einer Inkubation von 4 Stunden wird der Überstand entfernt und das freigesetzte $^{51}\text{Chrom}$ gemessen. Das freigesetzte $^{51}\text{Chrom}$ wird mit dem durch Inkubation von markierten Zellen in Detergens freigesetzten Chrom als Maximalwert und mit dem durch in Medium allein inkubierte markierte Zellen freigesetzten Chrom als Minimalwert verglichen. Wenn eine Lyse (bei der definitionsgemäß mindestens die doppelte Menge des Minimalwerts an $^{51}\text{Chrom}$ freigesetzt wird) beobachtet wird, bedeutet dies, daß es cytotoxische T-Lymphocyten unter den mononucleären Zellen des Patienten gibt und diese wahrscheinlich eine Infektion mit HIV anzeigen.

Ein derartiger Test zusammen mit Antikörpermessungen kann auch für Messungen der allgemeinen Immunantwort auf HIV und zu Prognosen verwendet werden. Diese Vorgehensweise kann ein sehr einfaches Verfahren sein, das zur Messung

der zellvermittelten Immunität in HIV-seropositiven Patienten verwendet werden kann. Das Verfahren kann auch automatisiert werden.

Durch einen Vergleich der Menge an freigesetztem Marker mit bekannten Standards kann ein Hinweis auf den Grad der Lyse und damit auf die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit HIV erhalten werden.

Das in vitro-Verfahren zur erfindungsgemäßen Stimulierung von HIV-spezifischen CTLs kann potentiell zur Therapie verwendet werden. Das Verfahren umfaßt eine Exponierung von gezüchteten peripheren mononucleären Blutzellen, die cytotoxische T-Lymphocyten enthalten, gegen autologe Zellen, mononucleäre Zellen oder lymphoblastoide B-Zelllinien, die eine Stunde mit einem geeigneten erfindungsgemäßen Peptid bei etwa 10 bis 100 µg/ml behandelt, anschließend in Gewebekulturmedium gewaschen und mit 3 000 rad bestrahlt worden waren. Die Zellen werden anschließend in Gegenwart von 10 Einheiten/ml Interleukin-2 gezüchtet. Unter Verwendung dieses Verfahrens wurden Zelllinien von Peptid-spezifischen cytotoxischen T-Lymphocyten gezüchtet und diese Linien auf bis zu 10^8 Zellen vermehrt. Diese vermehrten Linien von cytotoxischen T-Lymphocyten wurden zur Behandlung von Patienten durch Reinfusion verwendet.

Vorläufige Daten zeigen, daß Patienten mit AIDS oder dem AIDS-verwandten Komplex niedrige Niveaus einer cytotoxischen T-Zellaktivität zeigen, während die mit HIV infizierten, jedoch gesunden Patienten hohe Niveaus zeigen. Das Immunschwäche-Syndrom kann daher zum Teil das Ergebnis einer gehemmten Aktivität von cytotoxischen T-Zellen sein. Man würde daher vorschlagen, autologe cytotoxische T-Zellen, die in vitro auf mit synthetischem Peptid behandelten Zellen gezüchtet wurden, zu reinfundieren. Anfänglich wurden Patienten, die zuvor eine hohe cytotoxische T-Zellaktivität aufwiesen, in einem Stadium behandelt, in dem die Menge dieser Zellen abnimmt. Die cytotoxischen T-Zellen stammen vorzugsweise von Lymphocyten, die Patienten in einem früheren Stadium entnommen werden. Die Lymphocyten können in gefrorenem Zustand aufbewahrt werden, bis sie zur Herstellung der cytotoxischen T-Zelllinie verwendet werden.

Das Peptidepitop von HIV-gag-p24, das auf HLA B27 beschränkt ist, erwies sich bei unterschiedlichen Stämmen von HIV 1 und 2 als ziemlich konserviert, und es wurde festgestellt, daß die cytotoxischen T-Lymphocyten von einem mit HIV 1 infizierten Patienten mit der HIV 2-Peptidsequenz kreuzreagierten. Dies bedeutet, daß dieses Peptid und andere Peptidepitope von ähnlich konservierten Teilen des Virus zur Stimulierung eines Schutzes sowohl gegen HIV 1 als auch HIV 2 in Impfstoffen und ferner zur Diagnose und Therapie von mit HIV 1 und/oder HIV 2 infizierten Patienten verwendet werden können. Es wird angenommen, daß mindestens 50 % solcher Epitope auf diese Art konserviert sind.

Die Erfindung wird im nachstehend beschriebenen Beispiel näher erläutert.

Beispiel

Es wurde an dem Peptid mit der Sequenz NH_2 -Lysin-Arginin-Tryptophan-Isoleucin-Isoleucin-Leucin-Glycin-Leucin-Asparagin-Lysin-Isoleucin-Valin-Arginin-Methionin-Tyrosin-Cystein-COOH gearbeitet. Das Peptid stammt vom gag-p24-Protein von HIV zwischen den Resten 263 und 277. Das Carboxy-terminale Cystein ist kein Teil der HIV-gag-Sequenz und wurde zur Erleichterung von chemischen Kupplungsreaktionen angefügt. Es kann in der Zukunft möglich sein, dieses Peptid noch genauer zu definieren, wobei ein Optimum von 10 bis 12 Aminosäuren ermittelt wird.

Ein Verfahren zur Stimulierung der im peripheren Blut zirkulierenden Vorläufer von cytotoxischen T-Lymphocyten zur Weiterentwicklung in aktive cytotoxische T-Lymphocyten, die in vitro für HIV spezifisch sind, wurde erarbeitet. Dies wird nachstehend genauer beschrieben, umfaßt jedoch kurz gesagt eine 24-stündige Stimulierung einer kleinen Fraktion der peripheren Blutlymphocyten mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) und anschließende Zugabe dieser Zellen zu den verbliebenen Lymphocyten. Die PHA-Aktivierung bewirkt wahrscheinlich eine Aktivierung des HIV-Genoms, so daß HIV-Virus-Proteine synthetisiert werden. Nach einer siebentägigen Züchtung kann die Aktivität von cytotoxischen T-Lymphocyten gemessen werden, indem autologe Zielzellen (Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide B-Zelllinien), die mit einzelne HIV-Proteine exprimierenden rekombinanten Vacciniaviren infiziert sind, abgetötet werden.

Es wurde gezeigt, daß 70 bis 80% von HIV-seropositiven Spendern eine Antwort von cytotoxischen T-Lymphocyten auf das durch das rekombinante Vacciniavirus exprimierte gag-Protein liefern. Diese Antwort der cytotoxischen T-Lymphocyten wird durch HLA beschränkt, was bedeutet, daß nur die von nicht-verwandten Individuen erhaltenen Zielzellen lysiert werden, die HLA-Klasse I-Antigene mit der antwortenden T-Zelle teilen. Diese cytotoxischen T-Lymphocyten konnten mit dem T-Zell-Wachstumsfaktor, der das Lymphokin Interleukin-2 enthält, bis zu vier Wochen gezüchtet werden.

Nach der Herstellung dieser HIV-gag-spezifischen cytotoxischen T-Zelllinien konnte getestet werden, ob sie autologe Zielzellen in Gegenwart von kurzen (bis zu 20 Aminosäuren) synthetischen Peptiden lysieren konnten, die auf der HIV-gag-Sequenz basieren. Bisherige Arbeiten zeigten, daß Virusproteine wie gag den T-Zellen als abgebaute Peptidfragmente, die an HLA-Klasse I-Moleküle gebunden waren, auf der Oberfläche von infizierten Zellen präsentiert werden. Nach den bisher gefundenen und

veröffentlichten Grundsätzen (Townsend et al., Cell 44 (1986), 959-968, McMichael et al., J. Exp. Med. 164 (1986), 1397-1406, und Gotch et al., Nature 326 (1987), 881-882) wurden die cytotoxischen T-Lymphocyten, die nicht-infizierten Zielzellen und alle synthetischen Peptide zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml vermischt. In Gegenwart des richtigen Peptids wurden die Zielzellen lysiert, und das gag-Peptid 263-277 wurde durch die für gag und HLA B27 spezifischen cytotoxischen T-Lymphocyten erkannt. Es wurde zuvor für das Influenzavirus gezeigt, daß es unterschiedliche Peptidbereiche (Epitope) gibt, die gemäß dem beteiligten HLA-Klasse I-Molekül erkannt werden. Für HIV wurde das vorstehend beschriebene Peptid definiert, das mit dem HLA-Antigen B27 assoziiert ist. Aufgrund unserer bisherigen Arbeit mit dem Influenzavirus wird angenommen, daß alle oder die meisten auf HIV antwortenden Individuen mit HLA B27 dieses bestimmte Peptid erkennen.

Dieses Verfahren zum Auffinden von Epitopen kann zur Suche nach weiteren Epitopen, die mit anderen HLA-Klasse I-Molekülen assoziieren, verwendet werden. Das gleiche Prinzip gilt für jedes andere HIV-Protein.

Herstellung von peripheren Blutlymphocyten und Induzierung von HIV-spezifischen CTL

40 ml Venenblut von HIV-seropositiven Spendern wurden Heparin-enhaltenden Behältern (100 µl mit 100 Einheiten/ml Heparin ohne Konservierungsmittel) zugesetzt und in Abwesenheit von Serum mit RPMI 1640-Gewebekulturmedium (Gibco), dem 100 Einheiten/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden, 2:1 verdünnt.

5 ml Lymphocyten-Trennmedium (LSM, Flow Laboratories) wurden sorgfältig unter 15 ml Blut/Mediumgemisch in einem sterilen 25 ml-Plastik-Universalbehälter geschichtet. Das Röhrchen wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur bei 1200 Upm zentrifugiert, worauf hin periphere mononucleäre Blutzellen (PBMC) aus der Interphase entfernt wurden. Die PBMC wurden zweimal mit RPMI 1640 gewaschen, anschließend in 8 ml RPMI 1640 + 10 % fötalem Kälberserum ("R10") resuspendiert und gezählt. 1/8 der PBMC wurden in 50 ml Kolben (Falcon), denen R10 zugesetzt wurde, bis zu einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml inkubiert. Phytohämagglutinin (PHA - Wellcome Diagnostics) wurde bis zu einer Endkonzentration von 1/200 (2 µg/ml) zugesetzt. Diese Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C in 5 % CO₂ in Luft inkubiert. Die restlichen 7/8 der PBMC wurden bei 37°C bis zu einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ /ml in R10 in 5 % CO₂/Luft in einem 50 ml Gewebekulturkolben gezüchtet.

Nach 24 Stunden wurden die PHA-stimulierten Zellen zweimal in R10 gewaschen, in R10 mit $1,0 \times 10^6$ /ml resuspendiert und den unstimulierten Zellen zugesetzt. Die Kulturen blieben sieben Tage vor der Verwendung im cytotoxischen T-Zelltest im Inkubator. Nach sieben Tagen wurden der Kultur 10 Einheiten/ml T-Zell-Wachstumsfaktor (Lymphocult T, Biotest) zugesetzt und die wachsenden Zellen bei 0,5 bis 1×10^6 /ml gehalten, wobei alle 3 Tage R-10 zusammen mit 10 μ g/ml T-Zellwachstumsfaktor zugesetzt wurde.

Herstellung von Zielzellen

Mit Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide B-Zelllinien, die autolog auf HLA-Klasse I abgestimmt bzw. nicht abgestimmt sind, wurden gewaschen und zu 1 bis 5×10^6 /100 μ l in R10 resuspendiert. 300 μ Ci $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Cr^{51} Amersham) wurden zugesetzt und die Zellen eine Stunde bei 37°C in 5 % CO_2 -Luft inkubiert. Die Zellen wurden einmal gewaschen und anschließend in Peptidlösungen (Peptid-Stammlösung, die in R10 zu 1 mg/ml gelöst ist) zu einer Endkonzentration von 10 μ g/ml resuspendiert. Jedes Peptid wurde getrennt getestet. Jedes Gemisch wurde eine Stunde bei 37°C in 5 % CO_2 -Luft inkubiert, anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen, in R10 auf 2×10^5 Zellen/ml konzentriert und in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen mit runden Böden-Nunc) verteilt. Als Kontrollen dienten die autologen lymphoblastoiden B-Zelllinien, entweder nicht infiziert und nicht mit Peptid behandelt (negative Kontrolle) oder mit rekombinantem Vacciniavirus infiziert (10 pfu/Zelle 4 Stunden bei 37°C in 5 % CO_2 -Luft, positive Kontrolle) (McMichael et al., J. Gen. Virol. 67 (1986), 719).

Herstellung von Effektorzellen

Die Zellen wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 1 500 Upm geerntet und zur Verwendung im CTL-Test in R10 resuspendiert.

CTL-Test

Zielzellen wurden zu 10^4 Zellen/Vertiefung in 50 μ l R10 in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit runden Böden verteilt und Effektorzellen in 100 μ l des gleichen Mediums zugesetzt.

Für die Experimente wurden die Vertiefungen in zweifacher Ausführung befüllt. Kontrollen für die Hintergrund- ^{51}Cr -Freisetzung in Abwesenheit der

Effektorzellen (Mediumkontrollen) und maximale ^{51}Cr -Freisetzung in Gegenwart von 5 % Triton X-100 ("Triton" ist ein registriertes Warenzeichen von Union Carbide Chemicals and Plastics Co. Inc.; Detergens-Kontrollen) wurden in vierfacher Ausführung plattiert. Die Platten wurden 4 Stunden bei 37°C inkubiert und zur Zählung in einem Gammazähler wurden 75 μl Überstand in kleine Röhrchen abgetrennt. 75 μl 10 % Chlorverbindungen ("Chloros") wurden vor der Entfernung aus dem Sicherheitslabor zugesetzt. Die Lyse wurde durch die Formel berechnet:

% spezifische Lyse =

experimentelle Zählimpulse - Mediumkontrolle x 100

experimentelle Zählimpulse Detergenskontrolle - Mediumkontrolle

Die spontane Freisetzung von ^{51}Cr durch die Zielzellen bei alleiniger Gegenwart im Medium schwankte von 8 bis 30 % der freigesetzten Zählimpulse, in Gegenwart von Triton (registriertes Warenzeichen) X-100.

5 P a t e n t a n s p r ü c h e

1. In vitro-Verfahren zur Stimulierung HIV-spezifischer cy-
totoxischer T-Lymphocyten (CTL), umfassend den Erhalt
peripherer mononucleärer Blutzellen (PBMC) von einem
Individuum, das HIV-seropositiv ist, die Inkubation
10 einer Fraktion der PBMC mit Phytohämagglutinin für einen
Zeitraum, der ausreichend ist zur Aktivierung der CTL
und dabei zur Produktion aktivierter PBMC, das Waschen
der aktivierten PBMC und die gemeinsame Züchtung der ak-
tivierten PBMC mit einer zweiten, unstimulierten Frak-
15 tion der PBMC für einen Zeitraum, der zur Produktion ge-
züchteter, CTL-enthaltender PBMC ausreichend ist.

2. Verfahren zum Absuchen eines Peptids nach einem HIV-spe-
zifischen CTL-Epitop, umfassend:
20 den Erhalt von PBMC von einem Individuum, das HIV sero-
positiv ist; die Inkubation einer Fraktion der PBMC mit
Phytohämagglutinin für einen Zeitraum, der ausreichend
ist zur Aktivierung von CTL und dabei zur Herstellung
aktivierter PBMC; das Waschen der aktivierten PBMC; die
25 gemeinsame Züchtung der aktivierten PBMC mit einer zwei-
ten Fraktion unstimulierter PBMC für einen Zeitraum, der
ausreichend ist zur Produktion gezüchteter, CTL-enthal-
tender PBMC; die Inkubation der gezüchteten PBMC mit
markierten autologen Zielzellen oder lymphoblastoiden B-
30 Zellen, die auf einen menschlichen Leukocytenantigen
(HLA)-Typ und das Peptid abgestimmt sind; und die Be-
stimmung der Menge an freigesetztem Marker und die da-
durch bedingte Identifizierung eines HIV-spezifischen
CTL-Epitops.

35 3. Peptid, identifizierbar durch das Verfahren nach An-
spruch 2, das die Aminosäuresequenz eines Fragments des
gag-Proteins von HIV hat, das spezifisch mit einem be-

1 stimmten HLA-Klasse I-Molekül zur Stimulierung der CTL-
Immunität interagiert.

5 4. Peptid nach Anspruch 3, das die Sequenz NH_2 -Lysin-Argi-
nin-Tryptophan-Isoleucin-Isoleucin-Leucin-Glycin-Leucin-
Asparagin-Lysin-Isoleucin-Valin-Arginin-Methionin-Tyro-
sin-COOH hat.

10 5. Peptid nach Anspruch 3, das die Sequenz NH_2 -Lysin-Argi-
nin-Tryptophan-Isoleucin-Isoleucin-Leucin-Glycin-Leucin-
Asparagin-Lysin-Isoleucin-Valin-Arginin-Methionin-Tyro-
sin-Cystein-COOH hat.

15 6. Verfahren zur Untersuchung von PBMC eines Individuums
auf die Gegenwart HIV-spezifischer CTL, umfassend den
Erhalt von PBMC von dem Individuum, die Inkubation der
PBMC mit markierten autologen Zielzellen oder lympho-
blastoiden B-Zellen, die auf einen HLA-Typ abgestimmt
sind, und mit einem Peptid gemäß einem der Ansprüche 3,
20 4 oder 5, und die Bestimmung des Betrages an freigesetz-
tem Marker.

25 7. Impfstoff gegen AIDS, umfassend ein Peptid nach einem
der Ansprüche 3, 4 oder 5.

8. Impfstoff nach Anspruch 7, umfassend ein Peptid, das die
Sequenz NH_2 -Lysin-Arginin-Tryptophan-Isoleucin-Isoleu-
cin-Leucin-Glycin-Leucin-Asparagin-Lysin-Isoleucin-Va-
lin-Arginin-Methionin-Tyrosin-COOH hat.

30 9. Impfstoff nach Anspruch 7, umfassend ein Peptid, das die
Sequenz NH_2 -Lysin-Arginin-Tryptophan-Isoleucin-Isoleu-
cin-Leucin-Glycin-Leucin-Asparagin-Lysin-Isoleucin-Va-
lin-Arginin-Methionin-Tyrosin-Cystein-COOH hat.

1 10. Impfstoff nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9, umfassend ein Peptid, das mit HLA A1, A2, A3, B7 oder B44 interagiert.

5 11. Impfstoff nach einem der Ansprüche 7 bis 10, umfassend einen rekombinanten Mikroorganismus, der zur Expression der entsprechenden Peptidsequenz(en) hergestellt wurde.

10

15

20

25

30

35

>>> Enter BEGIN HOMEBASE for Dialog Announcements <<<
>>> of new databases, price changes, etc. <<<

Please enter SUBACCOUNT name/number:

?

Please enter SUBACCOUNT name/number:

? 033285-019

Is 033285-019 the SUBACCOUNT you want to use? (Y/N)

? y

Subaccount is set to 033285-019

File 1:ERIC 1966-2003/Oct 06

(c) format only 2003 The Dialog Corporation

Set Items Description

--- -----

Cost is in DialUnits

Terminal set to DLINK

? b351

17oct03 10:31:10 User034901 Session D12674.1

Sub account: 033285-019

\$0.25 0.071 DialUnits File1

\$0.25 Estimated cost File1

\$0.03 TELNET

\$0.28 Estimated cost this search

\$0.28 Estimated total session cost 0.071 DialUnits

File 351:Derwent WPI 1963-2003/UD,UM &UP=200366

(c) 2003 Thomson Derwent

Set Items Description

--- -----

? s pn=de 19814701

S1 1 PN=DE 19814701

? t 1/7

1/7/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012746148

WPI Acc No: 1999-552265/ 199947

**Treatment of brain disorders, especially manic depression, schizophrenia,
depression, autism, embryonic and postembryonic developmental disorders
of the brain, Down's syndrome, brain trauma or Parkinson's disease**

Patent Assignee: WANK R (WANK-I)

Inventor: WANK R

Number of Countries: 087 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 19814701	A1	19991007	DE 1014701	A	19980401	199947 B
WO 9950393	A2	19991007	WO 99EP2225	A	19990331	199949
AU 9933330	A	19991018	AU 9933330	A	19990331	200010
EP 1068299	A2	20010117	EP 99914560	A	19990331	200105
			WO 99EP2225	A	19990331	
DE 19980543	T	20010712	DE 1080543	A	19990331	200140
			WO 99EP2225	A	19990331	
JP 2002509942	W	20020402	WO 99EP2225	A	19990331	200225
			JP 2000541281	A	19990331	

Priority Applications (No Type Date): DE 1014701 A 19980401

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

DE 19814701 A1 16 A61K-035/14

WO 9950393 A2 G C12N-005/08

Designated States (National): AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN
CU CZ DE DK EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ
LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK
SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR
IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SL SZ UG ZW

AU 9933330 A C12N-005/08 Based on patent WO 9950393

EP 1068299 A2 G C12N-005/08 Based on patent WO 9950393

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT
LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

DE 19980543 T C12N-005/08 Based on patent WO 9950393

JP 2002509942 W 54 A61K-035/14 Based on patent WO 9950393

Abstract (Basic): DE 19814701 A1

NOVELTY - The use of stimulated peripheral blood mononuclear cells
(PBMK) to treat brain disorders is new.

ACTIVITY - Nootropic; antidepressant; antimanic; antiparkinsonian;
neuroleptic.

MECHANISM OF ACTION - None given.

USE - Especially for treating manic depression, schizophrenia,
depression, autism, embryonic and postembryonic developmental disorders
of the brain, Down's syndrome, brain trauma or Parkinson's disease.

pp; 16 DwgNo 0/0

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): A61K-035/14; C12N-005/08

International Patent Class (Additional): A61P-025/14; A61P-025/18;
C12N-005/06

? s pn=de 68925660

S2 1 PN=DE 68925660

? t 2/7

2/7/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008100646

WPI Acc No: 1989-365758/198950

**Peptide fragments of HIV - which interact with particular human leucocyte
antigen class 1 molecule to stimulate cytotoxic T lymphocyte immunity**

Patent Assignee: UNITED BIOMEDICAL INC (UNBI-N); MEDICAL RES COUNCIL
(MEDI-N)

Inventor: MCMICHAEL A J; NIXON D F; TOWNSEND A R M

Number of Countries: 016 Number of Patents: 009

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 346022	A	19891213	EP 89305604	A	19890602	198950 B
GB 2220939	A	19900124	GB 8912651	A	19890602	199004
JP 2036198	A	19900206	JP 89143951	A	19890606	199011
GB 2220939	B	19920226				199209
SG 9401306	A	19950113	SG 941306	A	19940908	199513
US 5459238	A	19951017	US 89363780	A	19890609	199547
			US 91807757	A	19911217	
			US 92999377	A	19921231	
EP 346022	B1	19960214	EP 89305604	A	19890602	199611
DE 68925660	E	19960328	DE 625660	A	19890602	199618
			EP 89305604	A	19890602	

US 5683701	A	19971104	US 89363780	A	19890609	199750
			US 91807757	A	19911217	
			US 9389603	A	19930712	
			US 94354884	A	19941209	

Priority Applications (No Type Date): GB 8912651 A 19890602; GB 8813746 A 19880610; GB 8815956 A 19880705; GB 8826445 A 19881111

Cited Patents: 1.Jnl.Ref

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 346022	A	E	7		
Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE					
SG 9401306	A				Previous Publ. patent GB 2220939
US 5459238	A		4	C07K-007/00	Cont of application US 89363780
					Cont of application US 91807757
EP 346022	B1	E	7	C07K-007/08	
Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GR IT LI LU NL SE					
DE 68925660	E			C07K-007/08	Based on patent EP 346022
US 5683701	A		5	A61K-038/04	Cont of application US 89363780
					Cont of application US 91807757
					Cont of application US 9389603

Abstract (Basic): EP 346022 A

A peptide having the amino acid sequence of a fragment of HIV which interacts specifically with a particular human leucocyte antigen (HLA) class I molecule to stimulate cytotoxic T lymphocyte immunity is claimed.

The peptide may have the sequence (I)

NH₂-Lys-Arg-Trp-Ile-Leu-Gly-Leu-Asn-Lys-Ile-Val-Arg-Met-Tyr-X-COO- H
(I) (X = Cys or is absent).

USE - The peptides may be used to provide vaccine against AIDS. They can also be used for assaying cells for the presence of cytotoxic T lymphocytes by incubating cells with labelled B lymphoblastoid cells matched for HLA type in the presence of the peptide which interacts with the relevant HLA type and determining the amt. of label released. It can also be used for treating a patient with AIDS or related conditions by administering cytotoxic T cells treated with the peptide which interacts with a HLA molecule present in the patient.

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): EP 346022 B

An in vitro method of stimulating HIV-specific cyto-toxic T lymphocytes (CTL), comprising obtaining peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from a subject who is seropositive for HIV, incubating one fraction of said PBMC with phytohaemagglutinin for a time sufficient to activate said CTL and thereby produce activated PBMC, washing said activated PBMC, and co-culturing said activated PBMC with a second, unstimulated, fraction of said PBMC for a time sufficient to produce cultured PBMC containing CTL.

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): GB 2220939 B

An isolated or synthesised peptide having the amino acid sequence of a fragment of HIV, which itself interacts specifically with a particular human leucocyte antigen (HLA) class I molecule, to stimulate cytotoxic T lymphocyte immunity.

Abstract (Equivalent): US 5683701 A

A composition, comprising a peptide having the sequence
NH₂-lysine-arginine-tryptophan-isoleucine-isoleucine-leucine-glycine-leucine-asparagine-lysine-isoleucine-valine-arginine-methionine-tyrosine-COOH and a carrier.

Dwg.0/0

US 5459238 A

Peptide has the sequence

NH2-Lys-Arg-Trp-Ile-Ile-Leu-Gly-Leu-Asn-Lys-Ile-Val-Arg-Met- Tyr-COOH.

Also claimed is a peptide having the sequence

NH2-Lys-Arg-Trp-Ile-Ile-Leu-Gly-Leu-Asn-Lys-Ile-Val-Arg-Met-Tyr-Cys-COOH.

USE - Peptides are fragments of HIV and react specifically with a particular human leucocyte antigen class 1 molecule to stimulate cytotoxic T lymphocyte immunity. As a potential vaccine against AIDS and for diagnosis and therapy. Active against HIV-1 and HIV-2.

Dwg.0/0

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-038/04; C07K-007/00; C07K-007/08

International Patent Class (Additional): A61K-037/00; A61K-038/00;

A61K-039/21; A61K-039/38; C07K-001/00; C07K-007/06; C07K-014/15

? save temp

Temp SearchSave "TD882" stored

? logoff

17oct03 10:31:39 User034901 Session D12674.2

Sub account: 033285-019

\$10.67 0.388 DialUnits File351

\$9.34 2 Type(s) in Format 7

\$9.34 2 Types

\$20.01 Estimated cost File351

\$0.22 TELNET

\$20.23 Estimated cost this search

\$20.51 Estimated total session cost 0.459 DialUnits

Logoff: level 03.02.02 D 10:31:39

You are now logged off